

*Helicobacter pylori*除菌後状態で有用な
胃がんリスクマーカーの同定

Identification of gastric cancer risk
markers that are informative in
individuals with past *H. pylori* infection

富山大学博士論文（医学）

富山大学大学院医学薬学教育部博士課程
生命・臨床医学専攻

消化器造血器腫瘍制御内科学

南條宗八

【要旨】

〔目的〕

Helicobacter pylori (*H.pylori*) 感染は胃粘膜にエピゲノム障害を誘発し、感染胃粘膜ではエピゲノム障害が蓄積している。この蓄積したエピゲノム障害が胃発がんの素地を形成し、特定のCpGアイランドのメチル化レベルが胃がんリスクと関連していることが明らかにされてきた。*H.pylori*除菌により胃がんリスクは減少するが、非感染者レベルまでは戻らず、残存する。そのため、感染者の除菌後の個人レベルでの発がんリスクマーカーの同定が臨床的に求められている。本研究では、除菌者で有用な胃がんリスクマーカーの同定を目的とした。

〔方法〕

胃がん患者27人と健常者34人から内視鏡的胃粘膜生検により検体を採取した。*H.pylori* 感染は、健常者では血清抗*H.pylori* IgG抗体テストで、胃がん患者では尿素呼気試験で解析された。対象者は全員、*H.pylori*試験陰性で胃粘膜萎縮があり、除菌後胃粘膜ではないが、感染胃粘膜の除菌後1年程度の胃粘膜に相当する（以下、除菌後近似状態）と推定して本研究結果を考察した。高メチル化CpGアイランドをゲノムワイドに探索するために、メチル化DNA免疫沈降-CpGアイランドマイクロアレイを行った。各検体のメチル化参照比率およびメチル化レベルは、DNAをバイサルファイト変換した後にメチル化特異的PCR法で解析された。

〔成績〕

除菌後近似状態の胃がん患者3人、除菌後近似状態の健常者3人の胃粘膜をそれぞれ集めて1検体とし計2検体でCpGアイランドマイクロアレイ解析を行い、前者で高メチル化状態の15個のCpGアイランドを単離した。次に、別の除菌後近似状態の胃がん患者10人と除菌後近似状態の健常者10人でメチル化参照比率を測定すると、7個のCpGアイランドが、前者で高メチル化レベルであった。さらに、また別の除菌後近似状態の胃がん患者21人と除菌後近似状態の健常者14人の検証群でも、同様の結果が得られた。また、検証群で算出したROC曲線の曲線下面積やオッズ比は、それぞれ0.78-0.84と12.7-36.0で、現在利用可能なリスクマーカーの0.60-0.65と5.0-5.7を上回った。

〔総括〕

今回、*H.pylori*感染が胃粘膜に誘発するエピゲノム異常をゲノムワイドに解析し、除菌後近似状態で有用な、7個の新規胃がんリスクマーカーを同定した。

今回同定した新規マーカーを利用することにより、*H.pylori*除菌後患者の胃がんリスクを個人レベルで評価することができ、そのリスクに合わせて定期検査の施行間隔を設定するなど個別化医療が可能となる。

【はじめに】

がんの早期発見は、罹患率や死亡率の低下のために重要であり、そのためには発癌リスクの高い患者を同定することが必要である。*H.pylori*感染は胃がんリスクを2.2～21倍に増やすが[1-4]、感染者の大多数は胃がんを発症しない。また、胃がんに関連した宿主の遺伝子多型も同定されているが、そのオッズ比は凡そ1.0～2.0の間と高くなく[5,6]、臨床的に有用な、オッズ比の高いリスクマーカーが望まれている。

最近、*H.pylori*感染が胃粘膜にエピゲノム障害、特にDNAメチル化異常を誘発することが明らかになった[7]。*H.pylori*感染胃粘膜では特定のCpGアイランドのDNAメチル化レベルが高く、除菌後に低下するが、非感染胃粘膜レベルまでは戻らず、一部残存する[8]。そして、その残存したDNAメチル化レベルは胃がんリスクと相関している[7,9]。

メチル化レベルと胃がんリスクとの関連は、これまで非感染胃粘膜と胃がん患者非がん部粘膜の比較で解析されてきた[7,9]。しかし、メチル化異常は*H.pylori*感染だけでも誘発されるし、個人レベルの除菌後胃粘膜の発がんリスク評価が臨床的に重要である。本研究では、除菌者で有用な胃がんリスクマーカーを同定することを目的とした。

【材料と方法】

1. 組織検体と*H.pylori*感染状態の決定

内視鏡検査でがんの無いことが確認された27人の健常者と病理学的に胃がんが確認された34人の胃がん患者を対象とした。健常者、胃がん患者はそれぞれ倫理審査委員会に認められた計画に基づいて、署名によるインフォームドコンセントを表明した。胃粘膜は前庭部から内視鏡的生検により採取された。

*H.pylori*感染は、健常者では血清抗*H.pylori* IgG抗体テスト（SRL、東京）で、胃がん患者では尿素呼気試験（大塚製薬、徳島）で解析された。また、*H.pylori*感染はその83%で胃粘膜の萎縮性変化を生じ[10]、除菌治療後にもその変化が残存する[11]ので、内視鏡的胃粘膜萎縮があれば感染歴ありと判断できる。*H.pylori*試験陰性で胃粘膜萎縮のある胃粘膜を除菌後1年程度の胃粘膜に相当すると推定し、「除菌後近似状態」と定義した。

2. DNAメチル化解析

メチル化DNA免疫沈降-CpGアイランドマイクロアレイ解析は、既報に従って施行した[12,13]。プローブの信号は、非メチル化状態を0、完全メチル化状態を1で表す「Me value」に変換した。

完全メチル化DNAと非メチル化DNAはそれぞれ、SSIメチル化酵素（New England Biolabs、アメリカ）によりメチル化されたゲノムDNAとGenomiPhi amplification system（GE Healthcare、イギリス）で増幅されたゲノムDNAを用いた。バイサルファイト変換は既報に従って行った[14]。

定量的メチル化特異的PCRは、メチル化配列特異的および非メチル化配列特異的プライマーセット（補足表1）、SYBR® Green I（BioWhittaker Molecular Applications、アメリカ）、iCycler Thermal Cycler（Bio-Rad Laboratories、アメリカ）で行った。検体の分子数は、既知の分子数（ $10^1 \sim 10^9$ 分子）を含んだ標準DNAと検体の増幅を比較して決定した。メチル化レベルとメチル化参照比率は既報に従って算出した[7,15]。

3. 統計解析

メチル化レベルとメチル化参照比率の平均の差はステューデント *t* 検定で解析した。曲線下面積とオッズ比はそれぞれ二項分布と二項ロジスティック回帰分析で解析した。解析は全てPASW statistics（SPSS、アメリカ）で行い、両側検定で*P*値0.05未満を有意とした。

【結果】

1. 胃がん患者非がん部で高メチル化状態のCpGアイランドの単離

除菌後近似状態の健常者胃粘膜3検体と除菌後近似状態の胃がん患者非がん部胃粘膜3検体をそれぞれ集めて1検体とし、計2検体でメチル化DNA免疫沈降-CpGアイランドマイクロアレイ解析を行った。胃がん患者検体でより高メチル化状態のCpGアイランドを次の基準で選択した。(1) 胃がん患者検体のMe valueが健常者検体より0.2以上大きい、(2) 健常者検体のMe valueが0.4未満、(3) 基準(1)と(2)を3連続のプローブで満たす。この基準で、計15個のCpGアイランドが単離された(表1)。

15個のCpGアイランドについて、除菌後近似状態の健常者10人と除菌後近似状態の胃がん患者10人から成るスクリーニングセットで、メチル化参照比率を評価した(補足表2)。7個のCpGアイランド(1番~7番; 表1)が健常者より胃がん患者で有意にメチル化参照比率が高値であった($P < 0.05$)。

2. 7個の新規マーカーの有用性の検証

7個のCpGアイランドの有用性は独立した検体群でメチル化レベルを測定することにより検証した(図1)。検証群には除菌後近似状態の健常者14人、除菌後近似状態の胃がん患者21人が含まれていた(補足表3)。また、比較のために、現在、不十分ながら胃癌リスクマーカーとして利用可能な2つのマーカーのFLNcとTHBDも解析した。7個のCpGアイランドのメチル化レベルは胃がん患者で健常者より有意に高く($P < 0.01$)、それぞれ2.8倍、1.5倍、3.8倍、2.3倍、2.5倍、1.8倍、3.8倍であった。FLNcのメチル化レベルは胃がん患者で高い傾向があったが($P = 0.087$)、THBDのメチル化レベルには有意差がなかった($P = 0.341$)。これらのデータから、7個のCpGアイランドのメチル化レベルは除菌後近似状態の胃がんリスクを評価できることが示された。

3. 7個の新規マーカーの胃がんリスクマーカーとしての強さ

検証群のうち健常者と胃がん患者を区別する時のROC曲線を描き、曲線下面積を算出した(表2、図2)。7個のCpGアイランドの曲線下面積は0.78から0.84の範囲で、0.5より有意に大きかった($P < 0.01$)。対照的に、現在利用可能な前述の2つのマーカーFLNcとTHBDでは、それぞれ0.69(95%信頼区間 0.51-0.87)と0.65(95%信頼区間 0.45-0.84)で、0.5と有意差が無かった。上記ROC曲線から最適な閾値を設定すると、7個のCpGアイランドのオッズ比は12.7から36.0の範囲であった(表2)。FLNcとTHBDではそれぞれ5.7(95%信頼区間 1.2-25.9)と5.0(95%信頼区間 1.1-21.8)であった。これらの結果から、除菌後近似状態での胃がんリスク評価マーカーとして、7個のCpGアイランドのメチル化レベルは、FLNcとTHBDよりもリスクマーカーとしての検出力が強いことが示された。

【考察】

本研究では、除菌後近似状態の健常者胃粘膜と除菌後近似状態の胃がん患者非がん部胃粘膜のゲノムワイドなメチル化解析を行うことにより、除菌後近似状態で有用な7個の胃がんリスクマーカーを単離した。それらの有用性は、除菌後近似状態の胃がん患者21人と同年齢の除菌後近似状態の健常者14人を含む35人で検証された。本研究は除菌後またはその近似状態でエピジェネティックな胃がんリスクマーカーを評価した初めての研究である。*H. pylori*除菌治療を受ける患者が増加しているにも関わらず[16]、現在の胃がんリスク評価方法である血清抗ピロリ菌抗体と血清ペプシノゲン試験の組み合わせは除菌後状態での評価が確立していないため[16-18]、本研究で明らかにした新規マーカーの有用性が期待される。

結論として、*H. pylori*除菌者で有用な7個の新規胃がんリスクマーカー候補を同定した。

【参考文献】

1. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*. 2001;345:784–9.
2. Forman D, Webb P, Parsonnet J. H. pylori and gastric cancer. *Lancet*. 1994;343:243–4.
3. Suzuki H, Iwasaki E, Hibi T. Helicobacter pylori and gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2009;12:79–87.
4. Edstrom AM, Held M, Hansson LE, Engstrand L, Nyre'n O. Helicobacter pylori in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology*. 2001;121:784–91.
5. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000;404:398–402.
6. Loh M, Koh KX, Yeo BH, Song CM, Chia KS, Zhu F, et al. Meta-analysis of genetic polymorphisms and gastric cancer risk: variability in associations according to race. *Eur J Cancer*. 2009;45:2562–8.
7. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, et al. High levels of aberrant DNA methylation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2006;12:989–95.
8. Nakajima T, Enomoto S, Yamashita S, Ando T, Nakanishi Y, Nakazawa K, et al. Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after Helicobacter pylori eradication. *J Gastroenterol*. 2010;45:37–44.
9. Nakajima T, Maekita T, Oda I, Gotoda T, Yamamoto S, Umemura S, et al. Higher methylation levels in gastric mucosae significantly correlate with higher risk of gastric cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:2317–21.
10. Asaka M, Sugiyama T, Nobuta A, Kato M, Takeda H, Graham DY. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in Japan: results of a large multicenter study. *Helicobacter*. 2001;6:294–9.
11. Ohkusa T, Fujiki K, Takashimizu I, Kumagai J, Tanizawa T, Eishi Y, et al. Improvement in atrophic gastritis and intestinal metaplasia in patients in whom Helicobacter pylori was eradicated. *Ann Intern Med*. 2001;134:380–6.
12. Yamashita S, Hosoya K, Gyobu K, Takeshima H, Ushijima T. Development of a novel output value for quantitative assessment in methylated DNA immunoprecipitation-CpG island microarray analysis. *DNA Res*. 2009;16:275–86.
13. Takeshima H, Yamashita S, Shimazu T, Niwa T, Ushijima T. The presence of RNA polymerase II, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoter CpG islands. *Genome Res*. 2009;16: 275–86.
14. Kaneda A, Kaminishi M, Sugimura T, Ushijima T. Decreased expression of the seven ARP2/3 complex genes in human gastric cancers. *Cancer Lett*. 2004;212:203–10.
15. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim MJ, Woods C, Fiala E, et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:6823–36.
16. Selgrad M, Bomschein J, Rokkas T, Malfertheiner P. Clinical aspects of gastric cancer and Helicobacter pylori—screening, prevention, and treatment. *Helicobacter*. 2010;15:40–5.
17. Kim N, Jung HC. The role of serum pepsinogen in the detection of gastric cancer. *Gut Liver*. 2010;4:307–19.
18. Mizuno S, Kobayashi M, Tomita S, Miki I, Masuda A, Onoyama M, et al. Validation of the pepsinogen test method for gastric cancer screening using a follow-up study. *Gastric Cancer*. 2009;12:158–63.

表 1. メチル化DNA免疫沈降-CpGアイランドマイクロアレイで同定したCpGアイランド

CGI 番号	遺伝子 シンボル	名前	位置	遺伝子との 相対的位置
#1	<i>EMX1</i>	empty spiracles, drosophila, homolog 1	2p14-p13	イントロン1
#2	<i>miR663</i>	microRNA 663	20p11.1	重複
#3	<i>NKX6-1</i>	NK6, drosophila, homolog 1	4q21.2-q22	イントロン1
#4	<i>OTP</i>	orthopedia homeobox	5q13.3	下流
#5	<i>OPLAH</i>	5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)	8q24.3	下流
#6	<i>CYP1B1</i>	cytochrome P450, subfamily 1B1	2p21	エクソン1
#7	<i>NEFM</i>	neurofilament, medium polypeptide	8p21	エクソン1
#8	<i>PMF1</i>	polyamine modulated factor-1	1q22	イントロン1
#9	<i>BDNF</i>	brain-derived neurotrophic factor	11p14.1	イントロン1
#10	<i>SSTR5</i>	somatostatin receptor 5	16p13.3	プロモーター
#11	<i>MYO1D</i>	myosin ID	17q11.2	イントロン1
#12	<i>CAMK2N2</i>	CaM-KII inhibitory protein	3q27.1	プロモーター
#13	<i>GATA4</i>	GATA binding protein 4	8p23.1	プロモーター
#14	<i>NFATC1</i>	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	18q23	プロモーター
#15	<i>ANKRD9</i>	ankyrin repeat domain 9	14q32.31	エクソン1

CGI, CpG アイランド

表2. 新規マーカーおよび現在利用可能なマーカーの曲線下面積とオッズ比

CGI 番号	遺伝子 シンボル	曲線下 面積	95%信頼区間	<i>P</i> 値	オッズ比	95%信頼区間	<i>P</i> 値
#1	<i>EMX1</i>	0.84	0.70 – 0.97	< 0.001	23.8	3.7 – 153	< 0.001
#2	<i>miR663</i>	0.78	0.62 – 0.94	0.006	26.7	2.8 – 258	0.005
#3	<i>NKX6-1</i>	0.84	0.69 – 0.99	< 0.001	15.0	2.8 – 80.1	0.002
#4	<i>OTP</i>	0.83	0.69 – 0.97	0.001	36.0	3.7 – 354	0.002
#5	<i>OPLAH</i>	0.83	0.69 – 0.98	0.001	15.6	2.9 – 83.5	0.001
#6	<i>CYP1B1</i>	0.78	0.62 – 0.94	0.006	12.7	2.1 – 76.7	0.006
#7	<i>NEFM</i>	0.84	0.71 – 0.98	< 0.001	23.8	3.7 – 153	< 0.001
–	<i>FLNc</i>	0.69	0.51 – 0.87	0.055	5.7	1.2 – 25.9	0.025
–	<i>THBD</i>	0.65	0.45 – 0.84	0.152	5.0	1.1 – 21.8	0.032

CGI、CpG アイランド

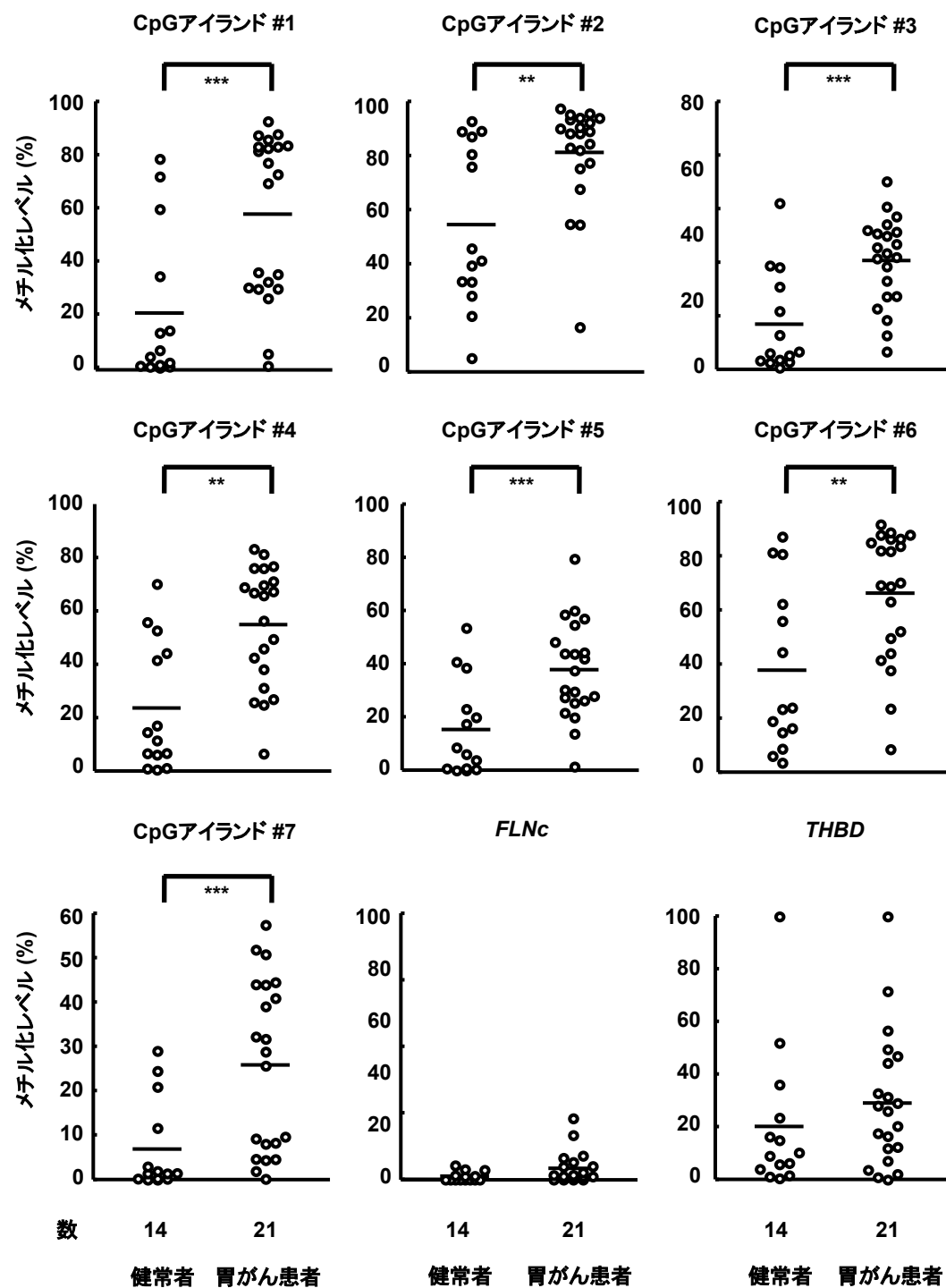


図1.
 検証群における7個のCpGアイランドと2個の現在利用可能なマーカーであるFLNcとTHBDのメチル化レベル。横線は各群の平均メチル化レベルを表している。7個のCpGアイランドのメチル化レベルは、健常者より胃がん患者で有意に高い($P < 0.01$)が、2個の現在利用可能なマーカーでは有意差が無い。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

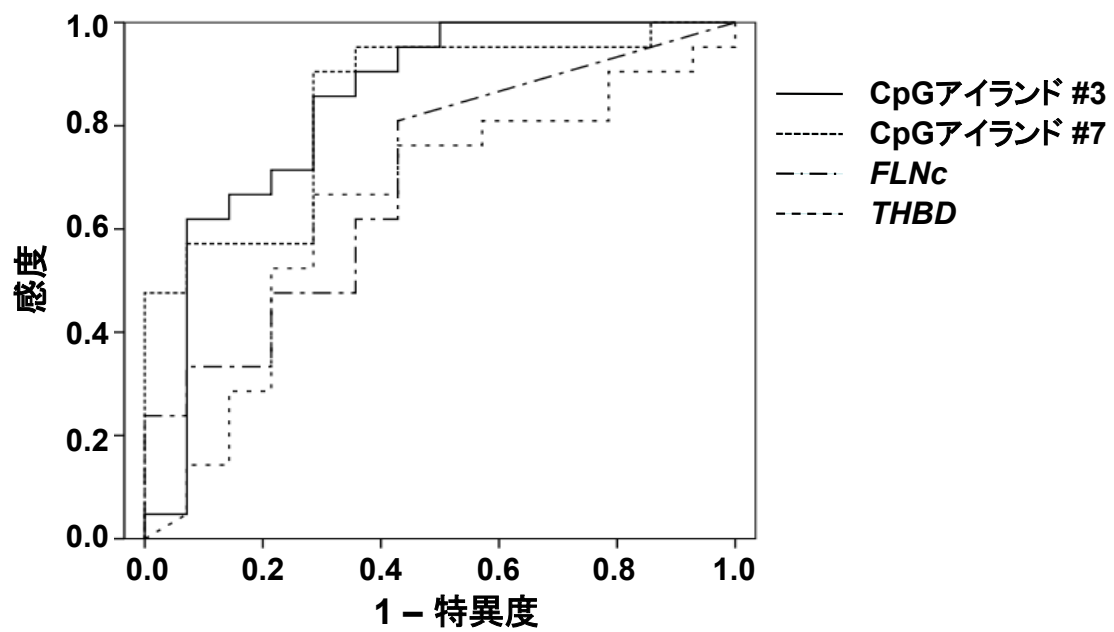


図2.

7個のCpGアイランドのうち曲線下面積が広がったCpGアイランド3番と7番および2個の現在利用可能なマーカーであるFLNcとTHBDのROC曲線。黒線、点線、一点鎖線、破線はそれぞれCpGアイランド3番、7番、FLNc、THBDのROC曲線を表している。CpGアイランド3番と7番の曲線下面積はFLNcとTHBDより広がった。

補足表1. メチル化特異的 PCR のプライマーと条件

CGI 番号	遺伝子 シンボル	状態 [§]		プライマー配列	長さ (bp)	温度 [£] (°C)
#1	EMX1	M	順	GTTTCGGGTTTTTCGGCGTC	117	58
			逆	CGCAAACATATTCCTTTTCGTTTCG		
		U	順	GAGTTGTTTTGGGTTTTTTGGT	123	58
			逆	ACACAAACATATTCCTTTTCATTCA		
#2	miR663	M	順	GTCGTCGTTTCGTATCGGTCG	139	60
			逆	AACGTCCTAACGAATTAACGCG		
		U	順	AAATGTTGTTGTTTGTATTGGTT	143	58
			逆	AACATCCTAACAAATTAACACA		
#3	NKX6-1	M	順	TATTTTTTCGTTTTCGTCGTC	104	58
			逆	GCTAATAAACGACTAAACGCTC		
		U	順	TGGTGAGTGGTTGGAAGTGTTT	98	64
			逆	TCTTACCCTCACCACCA		
#4	OTP	M	順	TATTTACGGTTTTTTTATTACGC	116	54
			逆	GCTATCGACACGAAACG		
		U	順	TGAGTGTTGTTGTTGGTATGAAAT	118	58
			逆	CAACCTCCCCATCACACA		
#5	OPLAH	M	順	AGTTATTCGGGAATTCGCGGTAC	80	60
			逆	CCCGACAAAACCGCCG		
		U	順	GTTGGTTTTTTTGGTAGAAGTTGTT	86	58
			逆	CACCCAAAACCTCCACAATACA		
#6	CYP1B1	M	順	TCGCGCGTTATTATCGTGC	110	58
			逆	AACACTACGAAAACCTTCGACCC		
		U	順	AGGTATTGTGAAAGTTTTTGGTTT	123	58
			逆	CTCCAAATCCAACCACACA		
#7	NEFM	M	順	GTTTCGGGATTAGCGTCGC	133	60
			逆	CCGCCGATAAACGAACG		
		U	順	TTGGTTATTTGTTGGTAGGTGGAT	142	58
			逆	AACCCAAAACCAACACCACA		

CGI、CpG アイランド、順、順方向 (5'→3'); 逆、逆方向 (3'→5')。§ M、メチル化 DNA 特異的プライマー; U、非メチル化 DNA 特異的プライマー; N、定量的メチル化特異的 PCR の標準化用プライマー、£ アニール温度。

補足表1の続きあり

補足表1. メチル化特異的 PCR のプライマーと条件(続き)

CGI 番号	遺伝子 シンボル	状態 [§]		プライマー配列	長さ (bp)	温度 [£] (°C)
#8	<i>PMF1</i>	M	順	GGTTTGTTGATTTTTCGCGC	112	60
			逆	AAAACAAAATAACCCTCGCCG		
#9	<i>BDNF</i>	M	順	ATTCGTAGGGCGATGTCGC	142	58
			逆	GATACCCGTTTCGAAACGACC		
#10	<i>SSTR5</i>	M	順	TTTTCGGGGTTATTTGTTTCGTC	134	58
			逆	CCGCCTACCAAAAAACGC		
#11	<i>MYO1D</i>	M	順	GTACGGGTCGATTAGTAGATCGC	103	58
			逆	CCCGACTAAAAAACGATCGC		
#12	<i>CAMK2N2</i>	M	順	TTTTATCGCGTTTTCGTTTCGTC	149	66
			逆	CCGAACCGCTAAACAACGAC		
#13	<i>GATA4</i>	M	順	CGTGTTGGAGAGAAAAACGC	88	62
			逆	CAACCCCAAATAACAACCGAC		
#14	<i>NFATC1</i>	M	順	TTTTTACGTAAGGAAAAAATACGAC	128	52
			逆	ACCCATATCGATCGAACG		
#15	<i>ANKRD9</i>	M	順	TTTCGGTCGGGAAGTCGC	95	60
			逆	GACTCCCGAACCGCACG		
-	<i>Alu</i> 繰り返し 配列	N	順	GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTTGTA ATTTTAGTA	98	57
			逆	ATTAATAAATAATCTTAACTCCTA ACCTCA		

CGI、CpG アイランド、順、順方向 (5'→3');逆、逆方向 (3'→5')。§ M、メチル化 DNA 特異的プライマー;U、非メチル化 DNA 特異的プライマー;N、定量的メチル化特異的 PCR の標準化用プライマー、£ アニール温度。

補足表2. メチル化 DNA 免疫沈降-CpG アイランドマイクロアレイで単離された15個の CpG アイランドのスクリーニングセットでのメチル化参照比率

CGI 番号	遺伝子シンボル	平均メチル化参照比率 (%)		P 値
		健常者	胃がん患者	
#1	<i>EMX1</i>	5.5	49.1	< 0.001
#2	<i>miR663</i>	6.0	61.4	< 0.001
#3	<i>NKX6-1</i>	7.9	57.8	< 0.001
#4	<i>OTP</i>	5.9	74.1	< 0.001
#5	<i>OPLAH</i>	6.4	64.5	< 0.001
#6	<i>CYP1B1</i>	16.2	51.3	< 0.001
#7	<i>NEFM</i>	6.3	40.1	< 0.001
#8	<i>PMF1</i>	44.8	49.0	0.423
#9	<i>BDNF</i>	0.1	2.1	0.122
#10	<i>SSTR5</i>	24.6	31.3	0.147
#11	<i>MYO1D</i>	7.7	6.1	0.656
#12	<i>CAMK2N2</i>	0.0	0.3	0.159
#13	<i>GATA4</i>	0.7	1.3	0.381
#14	<i>NFATC1</i>	39.7	52.7	0.235
#15	<i>ANKRD9</i>	71.7	84.8	0.104

CGI、CpG アイランド

補足表3. 検証群対象者の特性

		健常者	胃がん患者
検体数		14	21
性別	男性：女性	10：4	17：4
年齢	平均年齢	66.4	66.2
	範囲	39－83	59－75